

特異抗血清を用いるエストロゲン二重抱合体の直接ラジオイムノアッセイ

著者	丹羽 俊文
号	163
発行年	1985
URL	http://hdl.handle.net/10097/15703

氏 名（本籍）	に 丹	わ 羽	とし 俊	ふみ 文
学 位 の 種 類	薬	学	博	士
学 位 記 番 号	薬 博 第	1 6 3	号	
学位授与年月日	昭和 6 1 年	3 月	2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 （博士課程）薬学専攻			
学 位 論 文 題 目	特異抗血清を用いるエストロゲン二重抱 合体の直接ラジオイムノアッセイ			

（主 査）

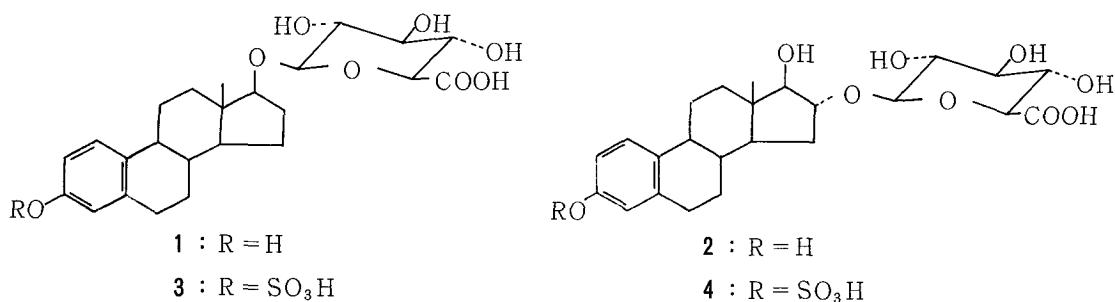
論文審査委員 教授 南 原 利 夫 教授 橋 本 嘉 幸

教授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

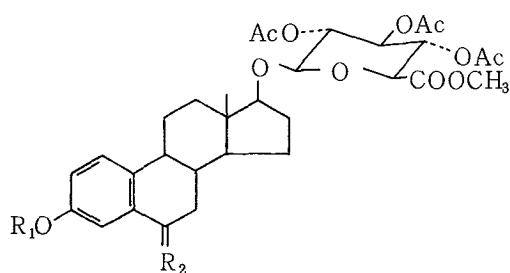
血中並びに尿中の estrogen レベルは、非妊時には排卵の予知・検知、卵巣をはじめとする性腺機能の、また妊娠時には胎児-胎盤系機能の診断指標として臨床上重要視されている。Estrogen は、生体内で種々変換をうけ、最終的にグルクロン酸あるいは硫酸などとの抱合体として存在し、排泄される。従来、この種の抱合体の分析は、酵素的あるいは化学的に水解し、遊離する非抱合型ステロイドを測定の対象とする間接的な方法がとられてきた。しかし、このような方法は操作が煩雑であり、脱抱合が定量的に進行し難いばかりか、抱合の形式、位置に関する情報を失うなどの欠点がある。そのため、脱抱合することなく抱合体のまま直接測定するアッセイ法の開発が求められるにいたっている。

1959年、Berson, Yalow により開発されたラジオイムノアッセイ法は、感度、特異性に優れ、また操作も簡便な方法であることから、生体内ステロイドの微量測定法としても広く普及しており、近年では抱合体を直接測定するイムノアッセイ法の開発も種々試みられている。しかし、グルクロニドの場合、従来のハプテン抗原はグルクロン酸部のカルボキシル基を高分子キャリアーとの結合に利用したものが多く、そのため産生する抗体の特異性は必ずしも十分ではなかった。そこで今回、estrogen に特徴的な構造をもつ A, D 環からともに離れた 6 位を介してキャリアーを結合させるため、抱合型 estrogen の [C-6] ハプテン化を試みた。まず D 環にグルクロニル基をもつ estradiol 17-glucuronide (1), estriol 16-glucuronide (2) を対象にとりあげ、[C-6]-BSA 結合体を調製して満足し得る抗血清を得た。ついで、臨床的意義が注目されながら抗血清の得られていない二重抱合体の estradiol 3-sulfate 17-glucuronide (3), estriol 3-sulfate 16-glucuronide (4) を対象に特異抗血清の調製を試みた。最後に生体試料への適用を目的として、これら抗血清を用いた血中 estrogen 二重抱合体の直接ラジオイムノアッセイ法を開発し、その有用性を明らかにした。



1. 抗Estrogen D環 Glucuronide 抗血清の調製

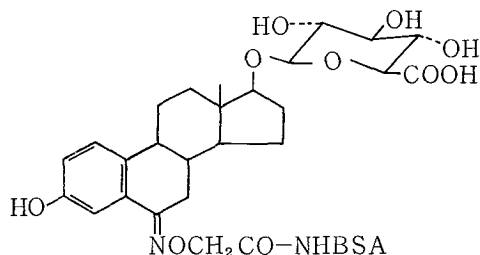
Estradiol より数工程で得られる 6-oxoestradiol を出発物質に用いた。3 位水酸基をベンジルエーテルとして保護した後、炭酸銀を触媒とする Koenigs-Knorr 反応に付し、17-glucuronide acetate-methyl ester (5) を製した。Pd-C 触媒を用いる加水素分解により脱ベンジル化後、carboxymethoxylamine と縮合させ、6-(O-carboxymethyl) oxime (6) に導いた。混合酸無水物法を用いウシ血清アルブミン (BSA) と結合させ 7 とした後、アルカリ水解によりグルクロン酸部の保護基を除去し、目的とする estradiol 17-glucuronide-BSA 結合体 (8) を得た。これについてハプテン/BSA の結合モル比を UV 法により求めたところ約 20 であった。



5 : $R_1 = \text{Bz}$, $R_2 = \text{O}$

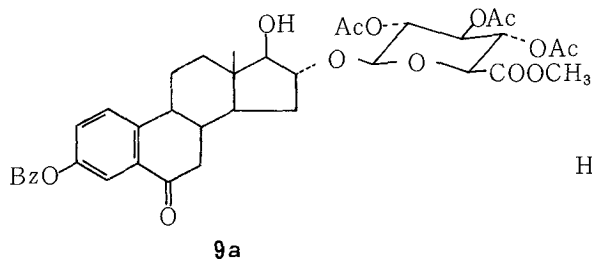
6 : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NOCH}_2\text{COOH}$

7 : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NOCH}_2\text{CO-NHBSA}$

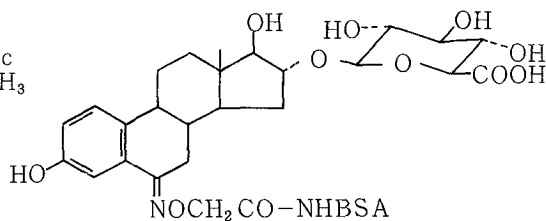


8

一方、6-oxoestriol を前述同様ベンジルエーテルとしたのち、Koenigs-Knorr 反応に付し、16-及び17-glucuronide acetate-methyl ester (9a,b) を約 12 : 1 の量比で得た。9a を脱ベ



9a



10

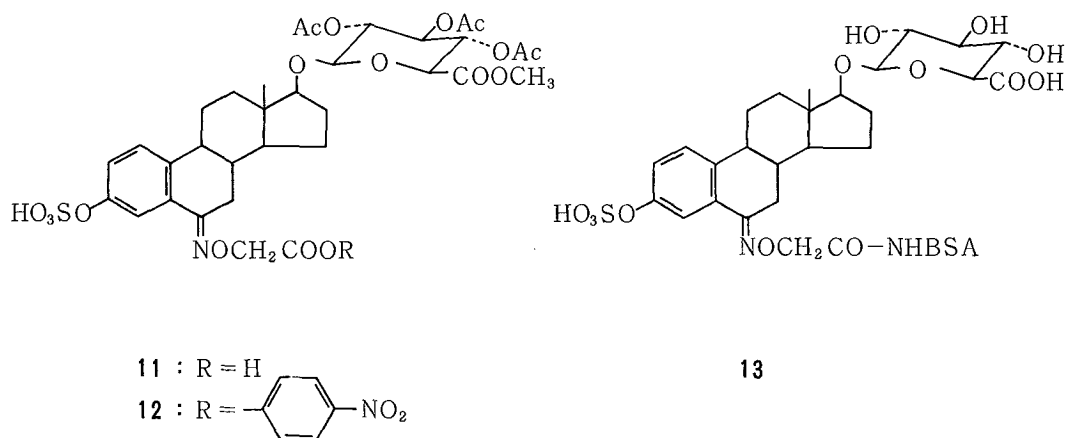
ンジル化し、estradiol 17-glucuronide の場合と同様にして estriol 16-glucuronide-(C-6)-BSA 結合体 (10) を調製した。このときハプテン/BSA の結合モル比は約 16 であった。

8, 10を Freund's complete adjuvant とともにそれぞれ雄性家兎に免疫し, 6 カ月後抗血清を得た。 $[^3\text{H}]$ 標識抗原を用いて近縁化合物との交差反応性を検討したところ, いずれも優れた特異性を有し, 従来の抗血清がとりわけ高い値を示した 3-sulfate D環 glucuronide 類との交差反応性はかなりの程度改善をみた。

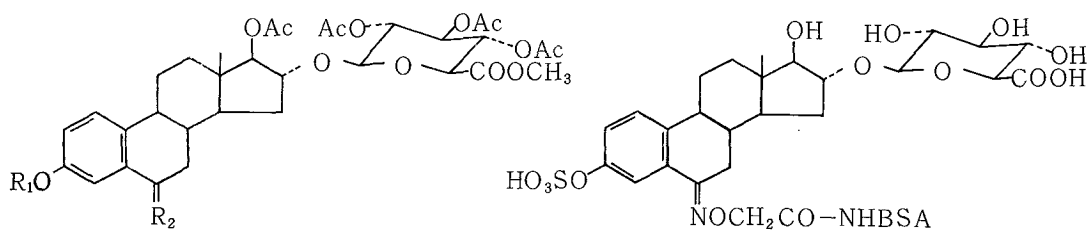
本法は, グルクロン酸部を acetate-methyl ester として保護したままブリッジを導入し, BSAと結合させた後, 保護基を除去する。それゆえ, ハプテン抗原の調製が容易であり, BSAを 6 位で選択的に結合させ得る利点がある。このため得られた抗血清は, A, D環の構造を同時によく識別し, 二重抱合体との交差反応性が減少したものと考えられる。

2. 抗 Estrogen 二重抱合体抗血清の調製

まず 6-oxoestradiol 17-glucuronide acetate-methyl ester 6-(O-carboxymethyl)-oxime (6) にピリジン中クロスルホン酸を作用させ, 3-sulfate (11) を製した。BSAとの結合に混合酸無水物法を用いると硫酸エステルが水解されるおそれがあるため, いったん p-ニトロフェノールと縮合させ活性エステル (12) に導いた。ついで温和な条件下交換反応により BSA結合体に変え, アルカリ水解により目的とするハプテン抗原 (13) を得た。このもののハプテン/BSAの結合モル比は約 18 であった。



一方, 9aをピリジン-無水酢酸で 17-acetate (14) とし, ついで加水素分解により脱ベンジル化後, 6-(O-carboxymethyl)oxime (15) に導いた。以下, estradiol 3-sulfate 17-glucuronide の場合と同様にして estriol 3-sulfate 16-glucuronide-[C-6]-BSA結合体 (16) を調製した。硫酸発色法によりハプテン/BSAの結合モル比を求めたところ, 約 14 であった。



14 : $R_1 = \text{Bz}$, $R_2 = \text{O}$

16

15 : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{NOCH}_2\text{COOH}$

13, 16 を前述同様家兔に免疫し、6 カ月後抗血清を得た。

ここに得られた抗血清の特性をラジオイムノアッセイにより評価するため、 $[^3\text{H}]$ 標識抗原を生合成的に調製した。 $[6, 7-^3\text{H}]$ Estradiol 17-glucuronide または $[6, 9-^3\text{H}]$ estriol 16-glucuronide を基質に用い、3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate の存在下、モルモット肝ホモジネート 105,000 xg 上清と 37°C でインキュベートした。生成物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分離精製し、 $[6, 7-^3\text{H}]$ estriol 3-sulfate 16-glucuronide を得た。

これら標識抗原を用いて抗血清の特異性を吟味したところ、近縁の抱合型ステロイドとの交差反応はほとんど認められず、抱合部位を含め二重抱合体の分子全体を認識していることが判明した。

従来、estrogen 二重抱合体の測定は、特異抗血清が得られないため、分画・水解を組み合わせた煩雑な方法がとられてきた。今回得られた抗血清は高い特異性を有し、脱抱合を要しない二重抱合体の直接ラジオイムノアッセイ法の確立に役立つものと期待される。

3. 血中 Estrogen 二重抱合体の直接ラジオイムノアッセイ

Estriol 3-Sulfate 16-Glucuronide : 炭末処理したヒト血清 (10-100 倍希釈) をアッセイ系に加えて検量線を作成したところ、内因性物質による妨害がみられず、50-1000 pg の範囲で測定可能であった。添加回収試験における回収率は良好であり、日内および日差変動ともに $\text{CV} < 10\%$ と満足のいく成績であった。つぎに本法の信頼性を吟味するため、HPLC-ラジオイムノアッセイ法による結果と比較したところ、良好な相関 ($r = 0.97$) が認められた。最後に妊婦における estriol 3-sulfate 16-glucuronide の血中レベルと妊娠週齢の関係を考察した。血中レベルは妊娠の進行とともに上昇し、末期においてとくに著しく、分娩後は急速に減少することが明らかとなった。

Estradiol 3-Sulfate 17-Glucuronide：炭末，ついでSep-pak C₁₈ 処理したヒト血清を用いて検量線を作成したところ，内因性物質などによる妨害もみられず，50-2000 pg の範囲で測定可能であった。添加回収率，日内および日差変動はいずれも良好（CV<12%）であり，また精度・正確度も満足し得るものであった。一方ブールした妊婦血清をHPLCに付し，estradiol 3-sulfate 17-glucuronide の存在をラジオイムノアッセイにより追跡した。酵素水解を行なわない血清では700-800 pg・ml⁻¹ の estradiol 3-sulfate 17-glucuronide が検出され，直接測定法による値とほぼ一致したのに対し，酵素水解後の血清からは検出されず，妊婦血中に estradiol 3-sulfate 17-glucuronide の存在が支持された。最後に妊娠の進行に伴う血中レベルを測定した。その結果，estradiol 3-sulfate 17-glucuronide は妊婦血中に少量ながら存在し，そのレベルは妊娠末期に上昇することが初めて明らかとなった。

ステロイド二重抱合体の直接ラジオイムノアッセイはこれが初めてであり，今後estrogen抱合体の体内動態の解明に役立つところ大と期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

エストロゲンの体液中レベルは、胎児胎盤系における機能状態の診断、正常月経周期婦人における排卵の予知などの指標として、その消長が臨床上きわめて重要視されている。エストロゲンは、主にグルクロン酸、硫酸との抱合体として排泄されるため、これらを直接測定するイムノアッセイ法の開発が種々試みられている。しかし、これに用いる抗血清の特異性は必ずしも十分ではなく、とりわけ二重抱合体の体内動態については未詳の点が多い。本研究は、estradiol (E_2) 3-sulfate (S) 17-glucuronide (G), estriol (E_3) 3-S 16-Gを対象に、〔C-6〕BSA conjugateを調製して特異抗体を産生させ、それを用い直接ラジオイムノアッセイ (RIA) 法を開発したものである。

まず E_2 17-G, E_3 16-Gをとりあげ、6-oxo E_2 , 6-oxo E_3 から数工程を経て、それぞれ 17-および 16-G acetate-methyl ester を製し、6-(O-carboxymethyl) oxime に導いた。ついで混合酸無水物法によりBSA結合体とした後、アルカリで水解して目的とするハプテン抗原を作製した。これらを家兎に免疫し、得られた抗血清について近縁化合物との交差反応性を吟味したところ、従来のものより遥かに高い特異性を有することが判明した。

これらの結果に基づき、 E_2 3-S 17-G, E_3 3-S 16-Gを対象として特異抗血清の調製を企てた。まず前述の acetate-methyl ester 6-(O-carboxymethyl) oxime を 3-sulfate に変え、活性エステル法によりBSA結合体とした。最後にアルカリで保護基を除去してハプテン抗原を作製し、前述同様家兎に免疫して抗血清を得た。一方、グルクロン酸抱合体を基質に用いモルモット肝ホモジネートとインキュベートし、 $[^3H]$ 標識抗原を生合成的に調製した。得られた抗血清の性質を吟味した結果、十分な親和性と力価を有し、近縁の抱合型ステロイドとの交差反応性から見てすぐれた特異性をもつことが判明した。

これら抗血清を妊婦血清エストロゲン二重抱合体の測定に適用し、簡便で信頼性の高い直接RIA法を開発した。その結果、妊婦血中に E_2 3-S 17-Gの存在が初めて立証されると共に妊娠の進行に伴うエストロゲン二重抱合体の体液中レベルの推移が明らかとなった。

以上、本研究は、従来未開拓のまま残されていたステロイドA、D環二重抱合体の特異抗血清の調製とそれを用いる直接RIA系の開発に成功したものであり、今後体内動態の解明に本法が大きく役立つことが期待される。学位論文として十分価値ある内容と認める。